

FATOR V DE LEIDEN NA DOENÇA DE LEGG-CALVÉ-PERTHES

LEIDEN'S V-FACTOR IN LEGG-CALVÉ-PERTHES DISEASE

LIA LIRA OLIVIER SANDERS, MANUEL BOMFIM BRAGA JÚNIOR, CÉSAR WAGNER MONTENEGRO CIMA, ROSA MARIA SALANI MOTA, MARIA INÊS DE M. C. PARDINI, SÍLVIA HELENA BAREM RABENHORST

RESUMO

Trobofilias hereditárias têm sido implicadas na patogênese da doença de Legg-Calvé-Perthes. Uma investigação do fator de risco hereditário mais comum para hipercoagulabilidade – a mutação no gene do fator V (fator V de Leiden) – foi conduzida em 20 pacientes com Legg-Calvé-Perthes e 214 controles sadios. A prevalência do fator V de Leiden foi maior nos pacientes com Legg-Calvé-Perthes que no grupo controle (30 vs. 1,87%). A razão de chances (odds ratio) para o desenvolvimento de Legg-Calvé-Perthes foi de 22,5 ($p < 0,05$; intervalo de confiança: 5,68- 89,07). Estes dados sugerem, o fator V de Leiden como fator de risco hereditário para hipercoagulabilidade associada ao desenvolvimento da doença de Legg-Calvé-Perthes.

Descritores: Doença de Legg-Perthes, Trombofilia, Fator V

Citação: Sanders LLO, Braga Júnior MB, Cima CWM, Mota RMS, Pardini MIMC, Rabenhorst SHB. Fator V de Leiden na doença de Legg-Calvé-Perthes. *Acta Ortop Bras.* [periódico na Internet]. 2009;17(2):40-2. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

A doença de Legg-Calvé-Perthes (LCP) uma disfunção do quadril que acomete crianças é resultado da degeneração da epífise femoral proximal do fêmur em virtude de uma insuficiência no fluxo sanguíneo local (necrose avascular). Embora a etiologia seja ainda desconhecida, trombofilias hereditárias vêm sendo sugeridas como potenciais causadores da doença.^{1,2}

Trobofilia pode ser definida como uma tendência aumentada a apresentar fenômenos tromboembólicos, seja esta hereditária ou adquirida. Uma vez que trombose é um evento incomum em crianças, a ocorrência de fenômenos trombóticos na infância frequentemente se relaciona a uma causa genética.³ Mutações no gene da protrombina (G20210A), da metilenoetrahidrofolato redutase (MTHFR) (C677T) e do fator V (G1691A) são fatores de risco hereditários para trombose bem estabelecidos na literatura.⁴⁻⁶

O fator de risco mais comum para trombose arterial e venosa é a resistência à proteína C ativada consequente a uma mutação no gene do fator V.⁷⁻⁹ A mutação do gene do fator V (fator V de Leiden) gera um estado de hipercoagulabilidade em virtude da resistência à ação anticoagulante da proteína C ativada.⁵ Normalmente, a proteína C ativada degrada o fator V ativado (Va), clivando os aminoácidos Arg306 and Arg506. Moléculas de fator V com a mutação de Leiden – em que Arg506 é substituída por glutamina (consequência da substituição de A por G na posição 1691 do gene) – são resistentes à degradação pela proteína C.^{5,10}

ABSTRACT

Inherited tendency to hypercoagulability has been suggested as a cause of vascular thrombosis resulting in Legg-Calvé-Perthes disease. An investigation of the most common inherited risk factor for hypercoagulability - the mutation in the V-factor gene (Leiden's V-factor) - was carried out among 20 Patients diagnosed with Legg-Calvé-Perthes disease. Patients were compared with 214 healthy controls. The prevalence of the Leiden's V-factor was higher in patients with Legg-Calvé-Perthes disease than in controls (30% vs. 1,87%). The odds ratio for the development of Legg-Calvé-Perthes disease in the presence of the Leiden's V-factor mutation was 22,5 ($p < 0,05$; confidence interval: 5,68-89,07). These data suggest the Leiden's V-factor as an inherited risk factor for hypercoagulability associated with the development of Legg-Calvé-Perthes disease.

Keywords: Legg-Perthes disease, Thrombophilia, V-Factor

Citation: Sanders LLO, Braga Júnior MB, Cima CWM, Mota RMS, Pardini MIMC, Rabenhorst SHB. Leiden's v-factor in legg-calvé-perthes disease. *Acta Ortop Bras.* [serial on the Internet]. 2009;17(2):40-2. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

A relação entre trombofilia e a doença de Legg-Calvé-Perthes foi demonstrada em vários trabalhos^{1,2,11-14}, com algumas controvérsias.¹⁵⁻²¹ Este estudo teve como objetivo examinar a associação entre o fator V de Leiden, como fator de risco hereditário para hipercoagulabilidade, e o desenvolvimento da doença de Legg-Calvé-Perthes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Pacientes

Cinquenta pacientes não-aparentados com diagnóstico de LCP - baseado em critérios clínicos e radiológicos - recrutados no Ambulatório de Ortopedia Clínica da Universidade Federal do Ceará (UFC) foram contactados, geralmente por correio (a maior parte dos pacientes reside no interior do estado, longe da capital, onde geralmente não há telefone disponível). Dos cinquenta pacientes contactados, foi possível coletar amostras de sangue dos 20 pacientes que puderam comparecer ao campus. O protocolo de investigação foi conduzido após aprovação pelo Comitê de Ética da UFC e com o devido consentimento informado assinado pelos responsáveis pelas crianças incluídas no estudo. Vinte pacientes com diagnóstico de LCP foram analisados. O grupo incluiu quinze meninos e cinco meninas. A média de idade por ocasião do diagnóstico foi de 6,55 anos (desvio padrão de 2,03, mediana: 6,5). A doença foi unilateral em 90% dos casos e cirurgia, realizada em dez pacientes (50%). Na família de um paciente, o pai tinha um diagnóstico objetivo de trombose.

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

Departamento de patologia, FM, UFC.
Endereço de Correspondência: LABGEM – Laboratório de Genética Molecular

Trabalho recebido em 07/01/08 aprovado em 21/04/08

Controles

A fim de avaliar a prevalência da mutação do fator V de Leiden em nossa população, foi realizada análise genética de 214 indivíduos saudáveis, sem passado de eventos tromboembólicos e representativos da população local (110 homens, 104 mulheres). A média de idade foi de $30,44 \pm 9,39$ anos (mediana: 28 anos). Na nossa região, onde o tipo étnico característico é o mestiço, os habitantes descendem predominantemente de índios e europeus, com raros descendentes de negros africanos.

MÉTODOS

DNA de alto peso molecular foi extraído de leucócitos do sangue periférico usando um método de "salting out".²² Para assegurar a qualidade da extração de DNA, eletroforese em gel de agarose e corado com brometo de etídio foi realizada.

Diagnóstico molecular

A mutação Arg506Gln no gene do fator V (fator V Leiden) foi identificada através da amplificação do fragmento correspondente ao exon 10 do gene do fator V, usando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* e condições como as descritas por Bertina et al.⁵ Subseqüentemente, 10 μ L do produto do PCR foi digerido com 2.5U de *Mnl I*, uma enzima que cliva o alelo normal em dois sítios, produzindo 3 fragmentos de 116bp (pares de base), 67bp and 37bp. Alelos mutados perdem um sítio de clivagem, originando apenas dois fragmentos de 153bp e 67bp após ação da referida enzima. Indivíduos heterozigotos originam tanto fragmentos normais como fragmentos mutantes. Em cada análise, amostras de paciente mutado, paciente normal e água destilada foram usados como controle. Após digestão enzimática, os fragmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida a 6%, coloração de prata. A fim de assegurar a legitimidade dos dados, os resultados positivos para a mutação foram reanalisados.

Análise Estatística

A análise estatística das diferenças entre os grupos foi realizada através do Teste Exato de Fisher. Razão de chances foi calculada para estimar o risco de desenvolver a doença de Legg-Calvé-Perthes. A população sadia local foi usada como grupo controle.

RESULTADOS

O fator V de Leiden (mutação do gene do fator V) foi encontrada mais freqüentemente nos pacientes com a doença de Legg-Calvé-Perthes (seis de vinte pacientes, 30%) que nos indivíduos controle (quatro de 214, 1,87%). A razão de chance (odds ratio) para o desenvolvimento da doença na presença do fator V de Leiden comparada com a ausência da mutação foi de 22.5 (intervalo de confiança: 5.683-89.075; $p < 0.05$; Teste Exato de Fisher). Entre os pacientes mutados, cinco apresentaram o padrão heterozigoto e um, homozigoto para a mutação.

DISCUSSÃO

O fator de risco mais comum para trombose arterial e venosa é a resistência à proteína C ativada devida à mutação do fator V^{5,7-9}, fator V de Leiden, que leva a um risco de trombose venosa 2 a 7 vezes maior entre heterozigotos e 20 a 80 vezes maior em homozigotos.²³⁻²⁸

Embora muitos trabalhos sugiram o fator V de Leiden como potencial causador da doença de Legg-Calvé-Perthes^{1,2,12-14} alguns estudos não demonstram relação entre a doença e a trombofilia.¹⁶⁻²⁰ Os resultados de Hayek et al.²¹ não implicam a trombofilia na patogênese da doença de Perthes (4.83% em pacientes, 10% em controles). Do mesmo modo, o estudo de Franco et al.¹⁵ não corrobora a associação entre o fator V de Leiden e LCP (razão de chance: 1.36; intervalo de confiança de 95%: 0.32-5.84).

A prevalência do fator V de Leiden nos pacientes analisados neste estudo (30%) é maior que a previamente descrita. Arruda et al.¹² relata a presença da mutação em 4.9% dos pacientes com LCP no estado de São Paulo, Brasil (0.7% em controles; $p = 0.03$). Eldridge et al.¹ descrevem uma prevalência de 9% entre os pacientes (5% em controles; razão de chance de 1.8), enquanto Glueck et al.¹³ indicam uma prevalência de 12.5% em pacientes e 1% no grupo controle. A prevalência da mutação encontrada na nossa população controle (1,87% vs. 0,7%) é semelhante à descrita no estudo brasileiro de Arruda et al.²⁹

De particular interesse é o estudo de Balasa et al.¹¹, comparando 72 pacientes com 197 controles sadios. A mutação do fator V foi mais comum em pacientes (11%) que em controles (5%, $p = 0,017$). A razão de chance para o desenvolvimento da doença na presença da mutação foi de 3.39, demonstrando uma associação entre o fator V de Leiden e a doença de Perthes.

Neste estudo, 20 crianças com LCP foram analisadas. A mutação foi encontrada em seis de vinte pacientes e quatro de 214 controles (OR 22.5; $p < 0.05$; Teste Exato de Fisher). Embora o pequeno número de pacientes não nos permita estabelecer a prevalência do fator V de Leiden entre os pacientes com a doença, estes resultados revelam uma associação entre a mutação e LCP. Para fins de ilustração, se os cinquenta pacientes originalmente pretendidos tivessem sido analisados e nenhuma outra mutação fosse identificada além das seis demonstradas, uma OR de 6.81 ainda indicaria uma correlação.

Outra limitação que pode ser argumentada é o fato de não haver crianças na população controle. Uma vez que a prevalência trombofilias hereditárias como o fator V de Leiden não se altera durante a vida, foi possível estimar a razão de chance considerando como grupo controle 214 indivíduos adultos sadios sem passado de eventos trombóticos, representativos da população local. Por fim, o estudo de Szepesi et al.¹⁴ sugere que a mutação do fator V influencia negativamente o curso da doença, particularmente em indivíduos homozigotos. Entre 47 pacientes com diagnóstico de Legg-Calvé-Perthes, quatro eram homozigotos e apresentavam uma forma mais severa de LCP. No presente estudo, entre os pacientes mutados apenas um apresentou o padrão homozigoto. Portanto, conclusões quanto à associação entre homozigotidade e severidade da doença não podem ser inferidas.

CONCLUSÃO

Apesar do pequeno número de pacientes, este estudo indica que, na nossa população, o fator V de Leiden pode estar associado com o desenvolvimento da doença de Legg-Calvé-Perthes. Embora estes resultados não possam ser considerados o risco real, eles indicam a importância deste fator na patogenia da doença de Perthes em nossa região. Estudos adicionais são necessários para quantificar essa associação.

REFERÊNCIAS

1. Eldridge J, Dilley A, Austin H, el-Jamil M, Wolstein L, Doris J et al. The role of protein C, Protein S, and resistance to activated protein C in Legg-Perthes disease. *Pediatrics*. 2001;107:1329-34.
2. Gruppo R, Glueck CJ, Wall E, Roy D, Wang P. Legg-Perthes disease in three siblings, two heterozygous and one homozygous for the factor V Leiden mutation. *J Pediatr Orthop*. 1998;132:855-8.
3. Manco-Johnson MJ. Disorders of hemostasis in childhood: risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost*. 1997;78:710-4.
4. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996;88:3698-703.
5. Bertina RM, Koelman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dieven RJ, de Ronde H. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994; 369:64-7.
6. Engbersen AM, Franken DG, Boers GH, Stevens EM, Trijbels FJ, Blom HJ. Thermolabile 5,10 methylenetetrahydrofoloreductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genetic*. 1995;56:142-50.
7. Lane DA, Mannucci PM, Bauer KA, Bertina RM, Bochkov NP, Boulyjenkov V. Inherited thrombophilia. Part 1. *Thromb Haemost*. 1996;76:651-62.
8. Dahlback B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:1004-8.
9. Rosendaal FR, Koster T, Vanderbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood*. 1995;85:1504-8.
10. Kalafatis M. Characterization of the molecular defect in factor V R506Q. *J Biol Chem*. 1995;270:4053-7.
11. Balasa VV, Gruppo RA, Glueck CJ, Wang P, Roy DR, Wall EJ et al. Legg-Calvé-Perthes disease and thrombophilia. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86:2642-7.
12. Arruda VR, Belangero WD, Ozelo MC, Oliveira GB, Pagnano RG, Volpon JB et al. Inherited risk factors for thrombophilia among children with Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop*. 1999;19:84-7.
13. Glueck CJ, Brandt G, Gruppo R, Crawford A, Roy D, Tracy T et al.. Resistance to activated protein C and Legg-Perthes disease. *Clin Orthop Relat Res*. 1997;338:139-52.
14. Szepesi K, Posan E, Harsfalvi J, Ajzner E, Szucs G, Gaspar L et al. The most severe forms of Perthes' disease associated with the homozygous Factor V Leiden mutation. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86:426-9.
15. López-Franco M, González-Morán G, De Lucas JC Jr, Llamas P, de Velasco JF, Vivancos JC et al. Legg-Perthes disease and heritable thrombophilia. *J Pediatr Orthop*. 2005;25:456-9.
16. Hresco MT, McDougall PA, Gorlin JB, Vomvakas EC, Kasser JR, Neufeld EJ. Prospective reevaluation of the association between thrombotic diathesis and legg-perthes disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84:1613-8.
17. Schmitz A, Pfortner J, Protzel A, Harbrecht U. Incidence of thrombophilic factor V Leiden and prothrombin G20210A mutation in Perthes disease – a pilot study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2001;139:143-6.
18. Sirvent N, Fisher F, el Hayek T, Appert A, Giudicelli H, Griffet J. Absence of congenital prethrombotic disorders in children with Legg-Perthes disease. *J Pediatr Orthop B*. 2000;9:24-7.
19. Gallistl S, Reitingner T, Linhart W, Muntean W. The role of inherited thrombotic disorders in the etiology of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop*. 1999;19:82-3.
20. Thomas DP, Morgan G, Tayton K. Perthes' disease and the relevance of thrombophilia. *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81:691-5.
21. Hayek S, Kenet G, Lubetsky A, Rosenberg N, Gitel S, Wientroub S. Does thrombophilia play an aetiological role in Legg-Calvé-Perthes disease? *J Bone Joint Surg Br*. 1999;81:686-90.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cell. *Nucleic Acid Res*. 1988;16:1215.
23. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, Taioli E, Rossi V, Crosti F et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood*. 1998;92:2353-8.
24. Martinelli I, Bucciarelli P, Margaglione M, De Stefano V, Castaman G, Mannucci PM. The risk of venous thromboembolism in family members with mutations in the genes of factor V or prothrombin or both. *Br J Haematol*. 2000;111:1223-9.
25. Simioni P, Sanson B-J, Prandoni P, Tormene D, Friederich PW, Girolami B et al. Incidence of venous thromboembolism in families with inherited thrombophilia. *Thromb Haemost*. 1999;81:198-202.
26. Middeldorp S, Henkens CM, Koopman MM, van Pampus EC, Hamulyak KH, van der Meer J et al. The incidence of venous thromboembolism in family members of patients with factor V Leiden mutation and venous thrombosis. *Ann Intern Med*. 1998;128:15-20.
27. Lensen RP, Bertina RM, de Ronde H, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR. Venous thrombotic risk in family members of unselected individuals with factor V Leiden. *Thromb Haemost*. 2000;83:817-21.
28. Simioni P, Tormene D, Prandoni P, Zerbini P, Gavasso S, Cefalo P et al. Incidence of venous thromboembolism in asymptomatic family members who are carriers of factor V Leiden: a prospective cohort study. *Blood*. 2002;99:1938-42.
29. Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM, Costa FF, Reitsma PH. Factor V Leiden (FVQ506) is common in Brazilian population. *Am J Hematol*. 1995;39:242-3.